

Validación del ensayo Vibriocida colorimétrico para determinar anticuerpos séricos contra cepas candidatas vacunales de *Vibrio cholerae*

Bárbara Cedré, Yutzandry Viel, Tamara Rodríguez, Gemma Año, Yadira Pino, Hilda García, Tania Valmaseda, Irma González, Ileana Delgado, Arturo Talavera, José Luis Pérez, Luis García

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: bcedre@finlay.edu.cu

El Instituto Finlay posee un grupo de cepas atenuadas candidatas a vacuna oral contra el cólera, las cuales fueron evaluadas desde el punto de vista de su capacidad inmunogénica mediante la determinación de anticuerpos por el método ELISA y principalmente por el ensayo Vibriocida. Este ensayo mide la funcionalidad de los anticuerpos estimulados por la cepa vacunal, por lo que se considera la herramienta más eficaz para medir el estado de la inmunidad en individuos vacunados contra el cólera y constituye el soporte analítico para el desarrollo de la vacuna anticolérica cubana. En este trabajo se evaluaron la precisión, la especificidad y la robustez del ensayo y los resultados obtenidos estuvieron dentro del criterio de aceptación de esta técnica (>50% de coincidencia). Se demostró que las variaciones entre las muestras negativas y positivas se debían precisamente al crecimiento de *V. cholerae* y que se pueden incorporar pequeños cambios al ensayo sin que esto traiga consigo variaciones en el título de la muestra ni falsos resultados. De acuerdo con los resultados obtenidos, el mismo se considera apto para la evaluación de la respuesta inmune estimulada por un candidato vacunal contra el cólera.

Palabras claves: *V. cholerae*, vacuna anticolérica, vibriocida, validación.

Introducción

La prueba realizada con mayor frecuencia para la determinación de anticuerpos funcionales contra *V. cholerae* es la de anticuerpos vibriocidas fijadores del complemento, ya que los resultados son sencillos de leer, se puede realizar con un mínimo volumen de suero y tiene alta sensibilidad (1), además de que la respuesta vibriocida sérica es la mejor correlación con la protección (2).

Cedré y col. en 1999 (3) realizaron una ligera modificación del ensayo Vibriocida original (1), donde al medio de cultivo que se añade para detener la reacción bactericida, se adiciona un indicador de pH y glucosa. La bacteria usada como antígeno en esta reacción (*V. cholerae*) utiliza en su metabolismo este azúcar, lo cual provoca la acidificación del medio, que conlleva a un cambio de color que permite una lectura mucho más clara, rápida y fácil de realizar por los analistas, incluso los menos experimentados.

El Instituto Finlay cuenta con un grupo de cepas atenuadas candidatas a vacunas, algunas de las cuales han sido evaluadas en ensayos de reactogenicidad e inmunogenicidad; esta última se ha determinado por los niveles de anticuerpos vibriocidas que la vacuna logra inducir. Por tal motivo resulta imprescindible

asegurar que este procedimiento analítico ofrezca resultados reproducibles y confiables que sean adecuados, con el propósito de emplearlo como ensayo de evaluación de la inmunogenicidad de un preparado vacunal contra el cólera.

Materiales y Métodos

Existen diversas variantes de ensayos que han sido empleadas para determinar la presencia de anticuerpos bactericidas séricos; en todas ellas siempre están presentes los tres componentes fundamentales: antígeno, anticuerpo y complemento. Para realizar la validación del ensayo nos dispusimos primeramente a la preparación de estos materiales.

Complemento

Como fuente de complemento se utilizó suero humano del grupo sanguíneo A+, obtenido de donaciones de bancos de sangre. Para la evaluación del suero como fuente de complemento se llevaron a cabo los siguientes ensayos:

Determinación de la actividad bactericida intrínseca o inespecífica

Se evaluaron tres sueros humanos de grupo A+ de donantes (Banco de Sangre de Marianao, Ciudad de La Habana).

Se preparó una suspensión bacteriana de las cepas *V. cholerae* VC 12 y VC 13, (antígenos usados en la reacción bactericida), pertenecientes al biotipo Clásico y a los serotipos Ogawa e Inaba respectivamente a partir de un crecimiento de 4 h en cuñas de agar Infusión Cerebro Corazón (BHI). La suspensión se ajustó en un espectrofotómetro (Pharmacia, Suecia) a una DO entre 0.9-0.95 a 550 nm con solución salina fisiológica y se realizó una dilución 1/10 para obtener una concentración de 3×10^7 UFC/mL. Se mezcló (V/V) con cada uno de los sueros a probar diluidos 1/5 y se incubó a 37 °C por 1 h junto con un control de suspensión de célula. Ambas suspensiones se sembraron en placas de agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) y se incubaron de 18 a 24 h a 37 °C. Se contó el número de colonias que creció en la placa donde se sembró la mezcla y se comparó con la placa control donde se sembró la suspensión celular. Se seleccionaron los sueros en los que se obtuvo un crecimiento mayor del 80% con respecto al control (4).

Valoración funcional

Se evaluó la potencia de la fuente de complemento titulando seis veces un suero control positivo de título conocido (1280), para el cual se debía obtener el mismo título +/- una dilución.

Luego de haber demostrado que no poseía propiedades bacteriolíticas intrínsecas y que poseía potencia como complemento, se confeccionaron alícuotas de 1 mL; una parte se congeló a -70 °C para utilizarlo en el ensayo de robustez y el resto se liofilizó y se almacenó a 4 °C.

Estandarización de la suspensión celular (antígeno)

El número de células que participan en la reacción bactericida es un factor decisivo en este ensayo; se determinó la correspondencia entre la densidad óptica (DO) y el número de UFC/mL.

Se ajustó la suspensión celular preparada según se describió anteriormente a valores de DO de 0.8, 0.9 y 1.0 respectivamente, a una longitud de onda de 550 nm. Se hicieron diluciones apropiadas con factor 10 en solución salina fisiológica y luego se sembraron en placas de agar BHI, las cuales se incubaron a 37 °C de 18-24 h para realizar conteo de UFC/mL.

Selección de las muestras de suero (anticuerpo)

Para este estudio se escogieron tres muestras de suero humano, provenientes de un estudio de reactividad e inmunogenicidad con la cepa *V. cholerae* 638 candidata a vacuna oral: una de alto

título de anticuerpos, una de bajo título, y una muestra negativa. Además, en cada placa se colocó siempre un suero control positivo de título conocido y un suero control negativo almacenados a -70 °C.

Procedimiento del ensayo Vibriocida

El día anterior a la prueba se sembraron las cepas VC 12 Clásico Ogawa y VC 13 Clásico Inaba en placas de agar BHI y se incubaron a 37 °C junto con cuatro cuñas del mismo medio sin inocular toda la noche. A la mañana siguiente se pasaron colonias aisladas de las placas a las cuñas precalentadas y se incubaron 4 h a 37 °C. El crecimiento se recogió con solución salina fisiológica estéril, se ajustó en un espectrofotómetro (Pharmacia, Suecia) a una DO entre 0,9 y 0,95 a una longitud de onda de 550 nm y se diluyó 1:10 con la misma solución (5).

El complemento liofilizado se restituyó al volumen original con solución salina fisiológica y se diluyó 1/5, luego se mezcló con igual volumen de la suspensión celular diluida 1/10.

Se hicieron diluciones dobles seriadas de las muestras de suero desde el pozo 1 hasta el 12 en una placa de microtitulación estéril de 96 pozos (Nunc, Dinamarca). La dilución correspondiente al primer pozo luego de añadir la mezcla bacteria-complemento fue 1/20 y del último pozo 1/40960. Las diluciones de los sueros se mezclaron con igual volumen de la mezcla bacteria-complemento y la placa se incubó 1 h a 37 °C para que ocurriera la reacción (5).

Para detener la reacción bactericida dependiente del complemento se añadieron 150 µL/pozo de medio caldo cerebro corazón (BHI) que contenía glucosa y púrpura de bromocresol, ambos al 2%. La placa se incubó nuevamente entre 3-4 h a 37 °C y se procedió a la lectura por observación visual.¹

El título se definió como el inverso de la mayor dilución del suero en la que se observó inhibición completa del crecimiento bacteriano, reflejado por la invariabilidad del color del medio de cultivo (azul) (3).

¹Procedimiento Normalizado de Operación 12-097 "Determinación semicuantitativa de anticuerpos séricos contra *Vibrio cholerae* por el método Vibriocida", aprobado 6/5/02, Instituto Finlay.

Validación del ensayo Vibriocida colorimétrico

Una vez preparados todos los elementos necesarios para ser utilizados en esta técnica, se procedió a la validación de la misma según el Protocolo de Validación confeccionado al respecto².

Los parámetros a evaluar fueron los siguientes: precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad), especificidad y robustez.

- **Precisión**

Repetibilidad (precisión intraensayo)

En este ensayo se evaluó según lo descrito una muestra de alto título, una de bajo título y una muestra negativa. Se realizaron seis réplicas de cada muestra. La titulación la realizó un solo analista, usando las mismas soluciones y equipos en todas las réplicas.

Precisión intermedia (precisión interensayos)

Se usaron las mismas muestras que en el ensayo de repetibilidad, pero los ensayos fueron realizados por dos analistas en un mismo laboratorio, usando soluciones diferentes preparadas por cada uno de ellos y la suspensión celular se ajustó en espectrofotómetros distintos.

Reproducibilidad (Precisión interlaboratorios)

Se evaluaron las mismas muestras empleadas en los ensayos anteriores, pero éste fue realizado por dos analistas, cada uno en un laboratorio diferente, usando soluciones preparadas por cada uno de ellos.

Criterio de aceptación

El 50% de las muestras deberían tener el mismo título con una desviación máxima de +/- una dilución.

- **Especificidad**

Se evaluó este parámetro para comprobar que el cambio de color que se produce en el medio de cultivo se debe específicamente al crecimiento bacteriano, para lo cual se tituló una muestra positiva de título alto realizando seis réplicas de la misma.

Después de realizar la lectura visual del ensayo, se extrajeron 10 µL de los pocillos implicados en la zona de cambio de color (los tres últimos pocillos de color azul y los tres primeros amarillos) en cada una de las réplicas. Las muestras extraídas de cada pocillo se

² PV 11-066 "Protocolo de Validación del ensayo bactericida colorimétrico para la determinación de anticuerpos séricos contra *Vibrio cholerae*", aprobado 6/5/02, Instituto Finlay.

diluyeron en solución salina estéril y se sembraron en placas de agar BHI con incubación a 37 °C durante 18 h. Se realizó el conteo de colonias y se calculó el número de UFC/mL y el porcentaje de sobrevivencia. Este procedimiento se realizó luego de la incubación de la reacción bactericida (T0), y 3 h después de la adición del medio (T3).

Criterio de aceptación

Para aceptar la especificidad del ensayo bactericida colorimétrico, el conteo medio de viables correspondiente a la zona de actividad bactericida (color azul), debió ser significativamente diferente del conteo medios de viables correspondiente a la zona de crecimiento (color amarillo), lo que indica que el cambio de color se debió específicamente al crecimiento bacteriano.

- **Robustez**

Se efectuaron 6 análisis de la muestra de alto título en 10 ensayos individuales, donde en cada uno se evaluó un factor diferente y uno de ellos se realizó según la metodología descrita.

Las variantes evaluadas fueron las siguientes:

Ajuste de la DO de la suspensión celular a 0.8 y 1.00; tiempo de reacción antígeno-anticuerpo-complemento de 30 min; buffer fosfato-salino (PBS) como diluyente de los componentes de la reacción; muestras de suero descomplementado a 56 °C durante 30 min; complemento diluido en agua destilada estéril; complemento diluido 1/10; medio de cultivo para detener la reacción: caldo Luria Bertani (LB) y caldo Triptona Soya (TSB).

Criterio de aceptación

El porcentaje de coincidencia del título en las réplicas de la muestra debió ser $\geq 50\%$ en todos los ensayos.

Para decidir si un factor tuvo una influencia significativa se compararon los títulos obtenidos del ensayo realizado según lo descrito (control), con los obtenidos en los ensayos con los factores alternativos. En todos los ensayos el título debió ser el mismo +/- una dilución.

Resultados y Discusión

Como antígeno para la prueba Vibriocida se pueden utilizar cepas de *V. cholerae* Inaba y Ogawa bien caracterizadas. Las cepas patrones usadas como antígeno en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, USA) son la VC 12 (*V. cholerae* O1 Ogawa) y la VC13 (*V. cholerae* O1 Inaba) y se recomienda siempre que sea posible el uso de

estas cepas, ya que esto permitirá la homologación de los resultados de muchos laboratorios. Por tal motivo escogimos estas cepas como antígeno de nuestro ensayo. Se determinó la correspondencia entre DO y UFC/mL ajustando la suspensión a valores de DO de 0.8, 0.9 y 1 respectivamente, a una longitud de onda de 550 nm. Este es el paso decisivo del ensayo ya que una suspensión de antígeno que esté demasiado concentrada o demasiado diluida puede alterar los títulos obtenidos (5).

Para las tres suspensiones ajustadas a diferentes DO se obtuvo un número de unidades formadoras de colonias dentro del mismo rango, es decir, pequeños cambios en la DO no producen un incremento considerable en el conteo de viables y pudimos comprobar que una DO de 0.9, efectivamente corresponde a un número de células de 10^8 y que al realizar una dilución de 1/10 el número de células que participan el ensayo es 10^7 , tal y como recomienda la bibliografía (1).

La determinación de la actividad bactericida intrínseca pone de manifiesto la actividad lítica generada por la propia fuente de complemento, ya sea porque contenga anticuerpos que reaccionan con la cepa utilizada en el ensayo, como es el caso de anticuerpos contra miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (6) o por la presencia de sustancias bactericidas como los antibióticos. Se evaluaron tres sueros del grupo A+ de forma independiente enfrentándolos a la cepa usada como antígeno. En los tres casos se obtuvo un 100% de crecimiento con relación al control de suspensión. Una recuperación de células mayor de un 80% se considera como carencia de actividad lítica. Se escogió este grupo sanguíneo puesto que por experiencia, con él hemos obtenido los mejores resultados ya que se ha visto que las personas con grupo O son más propensas a contraer la enfermedad (7, 8) y al parecer son también más susceptibles a las infecciones entéricas, por tanto, en el suero de estos individuos pueden estar

presentes anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con cepas de *V. cholerae*.

Procedimos a realizar una mezcla de estos tres sueros y probar su funcionalidad o potencia utilizándolo como fuente de complemento en un ensayo Vibriocida, al evaluar como muestra un suero positivo de título conocido. Esta prueba se hace con el objetivo de verificar que el complemento se activa en presencia de anticuerpos y no tiene deficiencia alguna de los elementos que lo componen. En este caso, obtuvimos siempre el título esperado, por lo que quedó confirmada su potencia.

El ensayo Vibriocida es la técnica de elección para evaluar una vacuna contra el cólera de cualquier tipo. Teniendo en cuenta que el objetivo principal de la validación es asegurar que un procedimiento analítico seleccionado dé resultados reproducibles y confiables, resulta imprescindible la validación del presente ensayo, de manera que brinde resultados confiables de la potencia de la vacuna.

La validación este ensayo comprendió la determinación de tres parámetros fundamentales: precisión, especificidad y robustez.

Para evaluar la precisión a tres niveles diferentes se determinó el título de anticuerpos a tres muestras de suero y se calculó el porcentaje de coincidencia para cada una entre las determinaciones.

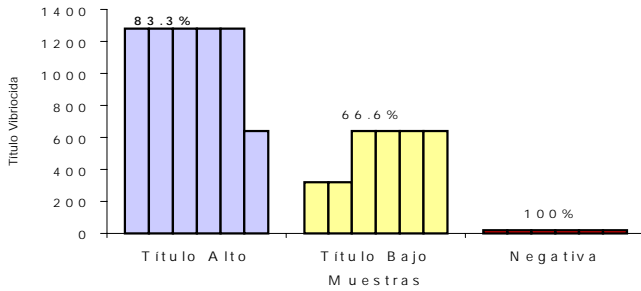
En el ensayo de precisión intermedia, los porcentajes de coincidencia estuvieron por encima del 50% en todos los casos, pero no alcanzó el 100%, debido a que este fue realizado por un operador menos entrenado y usando materiales y reactivos preparados por él, aunque se considera aceptable para este tipo de determinaciones, las variaciones en los títulos fueron siempre de más/menos una dilución (Figura 1).

Sin embargo, en el ensayo de repetibilidad, para las tres muestras evaluadas en las seis repeticiones realizadas para cada una se obtuvo un porcentaje de coincidencia de los títulos del 100% (Tabla 1)

Tabla 1. Porcentaje de coincidencia en los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad.

	Repetibilidad			Reproducibilidad		
	Alto título	Bajo título	Negativa	Alto título	Bajo título	Negativa
	1280	640	< 20	1280	640	< 20
	1280	640	< 20	1280	640	< 20
	1280	640	< 20	1280	640	< 20
	1280	640	< 20	1280	640	< 20
	1280	640	< 20	1280	640	< 20
	1280	640	< 20	1280	640	< 20
% coincid.	100	100	100	100	100	100

Figura 1. Porcentaje de coincidencia de los títulos de anticuerpos vibriocidas en el ensayo de Precisión Intermedia.



La determinación de la reproducibilidad se realizó en otro laboratorio de nuestro Instituto por un profesional con experiencia en este tipo de técnica y que la realiza rutinariamente, por lo cual obtuvimos también excelentes resultados, con una coincidencia entre las determinaciones del 100%, lo cual indica que el ensayo es altamente reproducible.

En todos los casos se obtuvo el título esperado más/menos una dilución, que es lo aceptado para la precisión intra e interensayos, siendo de dos diluciones para la precisión interlaboratorios, teniendo en cuenta que en esta técnica la determinación del punto final es cualitativa y está estrechamente ligada a la habilidad del técnico, lo que hace que variaciones de los títulos en una dilución no sean tomadas como diferencias significativas. Es de señalar que en todos los casos para la muestra negativa se obtuvo siempre el mismo valor, (título < 20), que es el inverso de la primera dilución del suero, por lo que podemos señalar que en el ensayo Vibriocida, estandarizado y validado en nuestro laboratorio no caben resultados falsos positivos ya que para las muestras negativas en ningún caso se obtuvo título de anticuerpos, independientemente de quien haya sido el operador, ni de quien haya preparado las soluciones y reactivos. Según el criterio de aceptación para este ensayo ($\geq 50\%$ de coincidencia), se puede considerar que nuestra técnica presenta muy buena precisión.

Otro de los parámetros evaluados fue la especificidad. Cedré y col. (3), introdujeron en nuestro laboratorio una modificación al método tradicionalmente reportado

por otros autores (1), que consiste en la adición al medio de cultivo que se utiliza para detener la reacción, el azúcar glucosa, y el indicador de pH púrpura de bromocresol. Los vibrios sobrevivientes de la acción lítica de los anticuerpos y el complemento, utilizan este metabolito fácilmente asimilable y como consecuencia se produce ácido, que cambia el indicador de color púrpura a amarillo. En este ensayo nos dispusimos a comprobar si efectivamente, este cambio de coloración en el medio era específico, como resultado del crecimiento de *V. cholerae*. Al realizar el conteo de las UFC/mL de los tres últimos pozos azules (zona de actividad bactericida) y los tres primeros amarillos, el número de células que crecieron en las placas estuvo en el mismo orden del que fue depositado en cada pocillo, por tanto, nos enfrentamos a la duda, de si había ocurrido solamente una inhibición del crecimiento por el carácter bacteriostático de la reacción o se había producido una lisis celular considerable aunque no total, y los vibrios sobrevivientes habían sido capaces de multiplicarse a expensas de los nutrientes del medio de cultivo empleado (Tabla 2).

Tabla 2. Ensayo de Especificidad. Conteo de viables a las 3 h de crecimiento.

	POZOS AZULES			POZOS AMARILLOS		
Pozo	7	8	9	10	11	12
UFC/mL	2.1×10^7	2.5×10^7	1.6×10^7	1.3×10^{10}	1.5×10^{10}	1.5×10^{10}
Media		2×10^7			1.4×10^{10}	

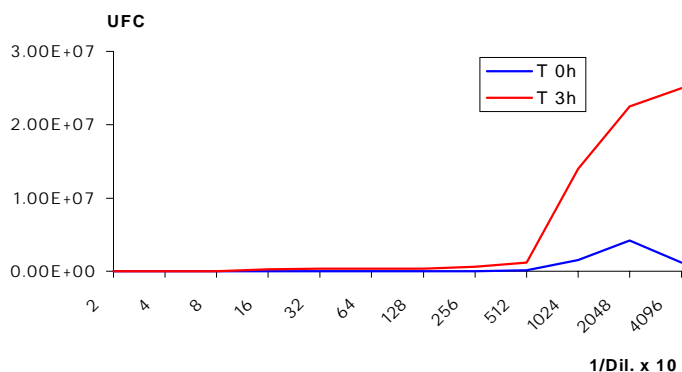
Estos resultados representan la media de seis determinaciones. Según el criterio de aceptación, el

conteo de viables medio correspondiente a la zona de actividad bactericida (color azul) debe ser

significativamente diferente del conteo de viables medio correspondiente a la zona de crecimiento (color amarillo), indicando de esta forma que el cambio de color se debe específicamente al crecimiento bacteriano, lo cual coincide con nuestros resultados, ya que la diferencia en el número de células entre ambas zonas fue de tres órdenes, lo cual se considera significativo desde el punto de vista estadístico.

Para aclarar la duda del carácter de la reacción se repitió este experimento, pero sembrando todos los pozos desde el 1 hasta el 12 inmediatamente después de la reacción bactericida y antes de detener la reacción. Se calculó el porcentaje de sobrevivencia considerando como el 100% el número de células presentes al inicio de la reacción (Figura 2).

Figura 2. Curva de sobrevivencia luego de la reacción bactericida.



En este experimento se pudo observar que el cambio de color en el medio corresponde al crecimiento específico de *V. cholerae* y que es necesario

De estos resultados se puede inferir que efectivamente, los anticuerpos generados por un preparado vacunal compuesto por células vivas atenuadas administradas por vía oral logran inducir anticuerpos séricos con actividad bactericida casi total.

Aunque las células sobrevivientes logran multiplicarse en el período de incubación debido a que se añade un medio de cultivo que contiene nutrientes esenciales para su viabilidad y multiplicación y logran sobrepasar aún el número de células que se añade, y teniendo en cuenta además, el corto tiempo de generación de *V. cholerae* y su rápida velocidad de crecimiento, quedó demostrado que existe una estrecha relación entre el número de células sobrevivientes, la concentración de anticuerpos en cada pozo y la coloración del medio.

El tercer parámetro que se evaluó fue la robustez del ensayo para precisar si pequeños cambios introducidos a la técnica conllevaban a grandes variaciones en los títulos de las muestras. Escogimos seis variables diferentes y cada una constituyó un ensayo. Las variables se escogieron con la línea de pensamiento de poner en práctica nuevas modificaciones que resultaran en una optimización de la técnica.

un número de células mayor que 10^6 para producir una cantidad de ácido suficiente para poder apreciar un cambio de color en el medio de cultivo.

El título obtenido por observación visual fue de 1280 correspondiente al pozo 7 de la placa. Después de ocurrida la reacción y antes de añadir el medio con el indicador de pH, el porcentaje de sobrevivencia en este pozo fue del 2%, observándose un aumento brusco en los siguientes pozos. Tres horas después de añadir el medio de cultivo, las células sobrevivientes se multiplicaron y alcanzaron un número del mismo orden del que había al inicio de la reacción.

Tradicionalmente se había utilizado como medio de cultivo el caldo BHI, el cual se utiliza también en nuestro laboratorio para la preparación del inóculo que se administra a los voluntarios de los estudios clínicos. Con la aparición de la enfermedad de las vacas locas se han producido importantes cambios en las regulaciones de los componentes presentes en medicamentos y vacunas de uso humano, cuya procedencia se relaciona con el ganado vacuno. Por esta razón se desestimó el uso de este medio para la preparación de productos para uso humano. Para racionalizar mejor los recursos del laboratorio y hacer más factible las compras nos dimos a la tarea de probar otros medios que fueran simples y así sustituir el BHI. Con tales fines se evaluó el medio Caldo TSB y el medio LB (9), preparados a partir de sus componentes. Con ambos medios el viraje del indicador de pH se produjo a las 3 h, tiempo para el cual se realiza normalmente la lectura con BHI y no hubo variación alguna en los títulos de las muestras a estudiar; para todas las repeticiones se obtuvo el título esperado y coincidente con el reportado con el medio BHI, pero hubo una diferencia más marcada entre los pozos positivos y negativos con el medio LB, resultado que nos satisface pues además éste es el medio más

simple y económico de los tres usados y uno de los de más amplio uso en el cultivo de *V. cholerae*.

En el procedimiento establecido para la determinación de anticuerpos vibriocidas (PNO 12-097), el tiempo de incubación para la reacción antígeno-anticuerpo-complemento es de 1 h, pero sería conveniente acortarlo con el fin de acelerar la lectura final, siempre y cuando no afecte el título de la muestra y así obtener los resultados en más breve tiempo. Por esa razón acortamos el tiempo de reacción a 30 min, y se obtuvo un valor para la muestra de alto título de 2560, es decir una diferencia de una dilución con respecto al obtenido en algunas determinaciones. Teniendo en cuenta que la lectura se hace de forma subjetiva, a simple vista, en términos generales se acepta esta diferencia. Se concluyó que acortar el tiempo de reacción de los elementos involucrados en la técnica no afecta los resultados de la misma.

Aunque la solución salina fisiológica contiene solamente NaCl y el PBS es diferente otras sales, este último es de uso común en todos los trabajos de microbiología e inmunología en nuestro laboratorio, por lo que sería conveniente sustituir la solución salina fisiológica por esta otra. Otros autores han evaluado el impacto de variar el diluyente usado en el ensayo bactericida y han utilizado para esto, medio de cultivo, PBS o solución salina fisiológica a la que se han adicionado iones Mg^{+2} (10).

El título vibriocida obtenido para la muestra evaluada usando PBS como diluyente tanto del suero, como de las células y del complemento fue de 2560, el mismo que se obtuvo cuando se usó solución salina fisiológica en el experimento para seleccionar el medio de cultivo. Otros autores obtuvieron resultados equivalentes (10), donde diferentes suspensiones preparadas con cada una de estas soluciones fueron igualmente sensibles a la lisis mediada por el complemento. Este aspecto no parece ser muy relevante en la reacción, puesto que en otros reportes han utilizado diferentes medios y soluciones. Neoh y Rowley (11) utilizaron complemento de curiel diluido 1/10 en peptona salina al 0,1% y Gangarosa y col. (6) prepararon las diluciones del suero en buffer Veronal salino, pH 7.2, mientras que Benenson, Saad y Mosley (1) las realizaron en agua destilada estéril. Aunque en nuestro caso hubo variación en los títulos cuando usamos agua, el cambio de color se observó a las 6 h, es decir, 3 h más tarde de lo que normalmente se lee la placa.

En el ensayo bactericida se añade un exceso de complemento a la reacción. Algunos autores recomiendan descomplementar las muestras de suero a

evaluar para lograr una homogeneidad en cuanto a la cantidad de complemento presente y que sólo participe en la reacción el complemento proveniente de vía exógena (5). Aunque no es la práctica corriente en nuestro departamento, quisimos determinar si esto tenía alguna influencia en el resultado. En este experimento el título vibriocida obtenido fue de 2560, al igual que en los ensayos anteriores. Esto era de esperar, puesto que el volumen de suero que se utiliza en la prueba Vibriocida es de 5 μ L, y consideramos que no aporta de manera importante una fuente de complemento adicional. Sin embargo, al diluir el complemento 1/10 en PBS, el título de la muestra cayó de 2560 a 640.

El complemento se puede utilizar fresco, congelado a $-70^{\circ}C$, durante un periodo aproximado de 3-6 meses (5). Nosotros, con el fin de prolongar su uso por un tiempo mayor decidimos liofilizarlo, que es uno de los métodos de conservación de bacterias y otros productos que permite su utilización por largos periodos de tiempo. En nuestra propia experiencia hemos utilizado cotidianamente complemento liofilizado de hasta tres años, sin pérdida de su potencia. El título obtenido con el complemento congelado fue 2560 y con el liofilizado 1280; la diferencia fue de una dilución, criterio aceptado en este tipo de ensayo como ya se había expresado anteriormente.

Uno de los factores críticos es el número de células usadas como antígeno en la reacción, ya que la sensibilidad del ensayo depende de la densidad bacteriana (6). El ajuste de la suspensión celular se realiza espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550 nm. Evaluamos un valor de DO inferior al que aparece en el procedimiento establecido y otro por encima para estudiar si esto conducía a un brusco aumento o disminución en el número de viables y por tanto, a una variación en los títulos de anticuerpos.

El conteo de viables no difirió de manera importante para ninguna de las tres DO probadas; para todas, el número de células estuvo en el orden de 10^8 . Es decir, que en un rango de DO entre 0.8 y 1.0 no se aprecian diferencias en el número de células. Esto se corroboró al realizar el ensayo Vibriocida ajustando la suspensión celular a cada una de estas DO, para las cuales se mantuvieron los títulos invariables (1280).

Cabe señalar que en los ensayos para determinar la robustez, el título que más se repitió fue 2560 y aunque este valor entra en el criterio de aceptación de esta prueba, queremos aclarar que todos estos ensayos de robustez se realizaron en un mismo día, pero diferente al de los ensayos de precisión.

El reporte original de este ensayo (1) ha sido modificado por el método que se presenta en esta validación, con el objetivo de contar con una prueba de mayor objetividad, la cual es conveniente realizar, específica y altamente reproducible. De estos resultados se puede concluir que el ensayo Vibriocida colorimétrico para detectar anticuerpos contra *V. cholerae* mostró una precisión dentro de los límites de aceptación para este tipo de ensayo, probó que el cambio de color que se observa en el medio de cultivo es debido al crecimiento de los vibrios sobrevivientes de la reacción bactericida y que pequeños cambios introducidos a la técnica no conllevan a variaciones en los títulos de anticuerpos.

Referencias

1. Benenson AS, Saad A., Mosley WH. Serological studies in cholera, Serum toxin neutralization -rise in the titre in response to infection with *Vibrio cholerae*, and the level in the "normal" population in East Pakistan. *Bull. WHO.* 1968; 38:287-295.
2. Hunt, MD, Woodward WE, Keswick BH, Dupont HL. Seroepidemiology of cholera in gulf coastal Texas. *Applied and Environmental Microbiology.* 1988; 54(7):1673-1677.
3. Cedré B, García H, García L, Talavera A. Estandarización y Evaluación del Ensayo Vibriocida modificado. *Rev. Cub. Med. Trop.* 1999; 51(3):156-159.
4. OMS. Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF): Validación. Programa mundial de vacunas e inmunización. Suministro y calidad de las vacunas. Red mundial de capacitación.1998.
5. CDC/NCID.OPS. Detección de anticuerpos contra *Vibrio cholerae* O1 y contra la toxina de cólera en los pacientes. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. Washington, DC.; Estados Unidos. 1994.
6. Gangarosa EJ, De Witt W E, Feely JC, Adams MR. Significance of vibriocidal antibodies with regard to immunity to cholera. *Journal of Infections Diseases.* 1970; 121:36-41.
7. Glass RI, Holmgren J, Haley CE. Predisposition for cholera of individual with O blood group. *Am Jour of Epidem.* 1985.121:791.
8. Faruque A, Mahalanabis D, Hoque SS, Albert MJ. The relationship between ABO blood groups and susceptibility to diarrhoea due to *Vibrio cholerae* O139. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 18:827-8.
9. Gotuzzo E, Cieza J. Cholera. *Clin North Am.* 1994; 8:183-205
10. Attridge RS, Joansson C, Trach DD, Quadri F, Svennerholm AM. Sensitive microplate assay for detection of bactericidal antibodies to *V. cholerae* O139. Clinical and diagnostic laboratory immunology. *American Society for Microbiology.* 2002; 383-387.
11. Neoh SH, Rowly D. The antigens of *Vibrio cholera* involved in the vibriocidal activity of antibody and complement. *J. Infect. Dis.* 1970; 121(5):505-512.

Validation of Colorimetric Vibriocidal Assay to Determine Serum Antibodies against Vaccine Candidate Strains of *Vibrio Cholerae*

Abstract

Finlay Institute possesses a group of attenuated strain candidates for an oral vaccine against cholera. Immunogenicity has been evaluated in volunteers by ELISA antibody determination and mainly by vibriocidal assay. Vibriocidal assay measures the functionality of antibodies elicited by a vaccine strain, that is why it is considered the most efficient tool for determining immunity levels against cholera in vaccines, for which reason, the validation of this test is very important. Precision, specificity and robustness were evaluated in this paper. The results were within the acceptance criteria for this technique (>50% coincidence). It was demonstrated that the differences between positive and negative samples were due precisely to *Vibrio cholerae* growth and that small changes may be introduced in the test without producing variations in sample titer or false results. According to these results, this test is considered appropriate to evaluate the immune response elicited by vaccine candidates against cholera.

Keywords: Vibriocidal, validation, precision, specificity, robustness